

4.1.2 Undergrupp: Ultraljudssyrd injektion och allmänna injektioner

Genom att manipulera genuttryck under utvecklingen av musembryon är det möjligt att undersöka deras betydelse i normal utveckling. Detta kommer att uppnås genom att med hjälp av elektroporering eller ultraljud-guidad injektion. Vi kommer att tillföra proteiner; RNA molekyler eller DNA-modifierande ämnen (tex virus) i embryot eller den amniotiska säcken runt musembryonen mellan dag E6.5 till E19 under utvecklingen. Injektion av farmakologiska substanser kan användas för att manipulera vissa celltyper utan behov av genmodifiering. T.ex. kan 6-OHDA användas för att selektivt utplåna dopaminerga nervceller.

Antalet djur är en uppskattad siffra och kan komma att ändras men aldrig överstiga det totala antalet sökta djur.

Mus (*Mus musculus*), 1000 st, Försöksdjursanläggning

Beskrivning av ras, stam och egenskaper som kan medföra lidande för djuren samt motivering av valet av djur med dessa egenskaper

Vänligen se Försöksgrupp "Allmänna åtgärder".

Genetiskt modifierade djur används: Ja

Diarienummer på tillstånd samt beskrivning och motivering av metoder.

Vänligen se Försöksgrupp "Allmänna åtgärder".

Embryon används av detta utvecklingsstadium: E6.5 - E19

4.1.2.1 Beskrivning av de åtgärder/ingrepp djuren kommer att utsättas för

Åtgärd 1: Injektion av virus, tracers (t.ex. fluorescerande dextran eller cell-permeabla fluorescerande substanser), mRNA, miRNA, RNA, modifierat RNA, DNA, protein, eller framakologiska substanser i embryon.

Ingående beskrivning av åtgärden och hur djuret kommer att påverkas

Vad djuret kommer att utsättas för inklusive försöksperiodens längd för det enskilda djuret.

Beskrivning av hur djuret kommer att påverkas – eventuellt fysiskt och psykiskt lidande.

1. Mössen paras. Beroende på experiment paras mössen övernatt, tidigt på morgonen eller under dagen. K112 på dagen (efter parningen under natten) de blir gravida räknas som dag 0.5, eftersom de förväntas ha parat sig mitt i natten. Injektion sker innan dag 19.
2. Honan sövs med isofluoran (induktion 2-4%, underhåll 1.5-3%) eller vad veterinären i enstaka fall rekommenderar, och förs över till en uppvärmd platta för operation. Håret på buken avlägsnas med rakapparat eller hårborttagningsmedel, t.ex. Veet. Graviditeten verifieras med ultraljud innan operation. I vissa fall sker denna verifikation dagen innan, med samma procedur, för att kunna planera injektioner nästa dag.
3. Narkosmedel (isofluoran, induktion 2-4%, underhåll 1.5-3%), smärtlindring (Buprenorfin (0,05-0,1mg/kg, s.c.) och/eller Finadyne (2.5mg/kg s.c.) och/eller anti-inflammatoriska smärtstillande (anti inflammatory non steroidal drugs, t.ex meloxicam 5mg/kg SC), och/eller annat av veterinär rekommenderat smärtstillande och öngongel administreras innan proceduren påbörjas.
4. Ett litet snitt (ca 1cm) görs i buken och ett horn från livodern tas ut, och hålls fuktig med NaCl-lösning eller PBS.
5. Injektion av virus, (t.ex. fluorescerande dextran eller cell-permeabla fluorescerande substanser), radioaktiva ämnen, mRNA, DNA eller farmakologiska substanser fostervattnet, eller specifika organ i embryot (t.ex. hjärna, hjärtat, levern, ryggraden o.s.v.) med hjälp av ultraljud. När injektionerna på en sida av livmodern är klar, förs embryona tillbaka in i modern. Vid behov kan den andra sidan tas ut och injiceras, beroende på hur många embryon som skall injiceras för försöket. Volymen av injektionen är anpassad till utvecklingsstadiet av embryot och organet ifråga (t.ex. 1 µl vid injektion av fostervattnet vid E9.5). Operationen (från sövning till uppvaknande) förväntas ta 30 min eller mindre.
6. Efter operationen sys muskulaturen ihop med kirurgisk nål/tråd, och huden häftas ihop, för att minska tiden på operationsbordet. Innan uppvaknandet märks örat med ett litet standard snitt för identifikation, eller så markeras svansen med tuschpenna, eller så markeras pälsen med en pälsenna.
7. Uppvaknandet är övervakat och sker i en uppvärmd bur. Djuret kan injiceras med steril koksaltlösning (0,5-1ml, s.c.) vid behov.

I en del fall kan den dräktiga honan ha behandlats med eller kan komma att behandlas med tamoxifen för att inducera genmodifikationen via CreER/FlipER och/eller efter elektroporeringen med thymidinanaloger (se försöksgrupp 4.1).

Injicerade embryon analyseras antingen vid olika embryonala stadier eller efter födseln (upp till 20 veckor postnatalet).

För embryouttag avlivs mamman och embryonerna samlas in. Embryoner från E13.5 och äldre avlivs via dekapitering. För postnatale p0-p10 (avlivs via dekapitering) eller p11-p21 (avlivs med CO2) avlivs honan och därefter ungarna. För ungar som tas vid senare tillfälle avlivs honan vid avvänjning. Ungarna avlivs p21 upp till 20 veckors ålder genom CO2.

Operationen kan innebära en viss stress hos djuret. Administration av smärtstillande kan ge en kort och snabb övergående smärta då det sker via injektion. Själva injektionerna ger ingen effekt på embryonen eller mamman.

Vi förväntar oss ingen negativ effekt på embryon då vi riktar in oss på specifika regioner.

Motivering av åtgärden – varför den behöver göras och varför beskrivet sätt är det bästa sättet att utföra åtgärden på

Vår metod används för genmodifiering, genmanipulering och tillförsel av farmakologiska substanser. Det är en mycket kraftfull metod för att utveckla musmodeller, och eftersom att inga djur behöver korsas kan man använda mycket färre möss. Denna teknik låter oss studera många olika sjukdomar, även de som orsakas av mutationer i flera olika gener, samt hur de samverkar i en in vivo kontext. Genom att använda ultraljud kan nålen styras till exakt rätt ställe för injektion och specifika organ behandlas effektivt.

Beskrivning av vad som ska göras för att minska djurets lidande – både farmakologisk lindring och övriga insatser liksom ökad tillsyn

Bedövningsmedel (isofluoran induktion 2-4%, underhåll 1.5-3%) eller vad veterinären i enstaka fall rekommenderar.

Smärtstillande Buprenorfin/Temgesic (0.05-0.1mg/kg kroppsvikt,s.c) eller Finadyne (2.5mg/kg s.c) används innan operation eller annat av veterinär rekommenderat smärtstillande. Vid behov upprepas injektion efter 8 timmar.

Ögongel administreras innan proceduren påbörjas.

Uppvaknandet sker övervakat i en uppvärmd bur. Vår erfarenhet av detta försök är att möss vaknar inom sekunder/ett par minuter och uppvisar normala beteenden och motorik.

Åtgärd 2: Injektion av virus, tracers (t.ex. fluorescerande dextran eller cell-permeabla fluorescerande substanser), mRNA, miRNA, RNA, modifierat RNA, DNA, protein, eller farmakologiska substanser i postnatale möss.

Ingående beskrivning av åtgärden och hur djuret kommer att påverkas

Vad djuret kommer att utsättas för inklusive försöksperiodens längd för det enskilda djuret.

Beskrivning av hur djuret kommer att påverkas – eventuellt fysiskt och psykiskt lidande.

Musen sövs med isofluran (isofluoran, induktion 2-4%, underhåll 1.5-3%) eller vad veterinären i enstaka fall rekommenderar, och förs över till en uppvärmd platta för operation. Håret över injektionsområdet avlägsnas med rakapparat eller hårborttagningsmedel, t.ex. Veet. Hårborttagning medför ingen smärta. Ultraljud används (vid behov) för att visualisera underliggande organ/benstrukturer, blodkärl o.s.v. Ögongel appliceras och smärtlindring ges. Ämnet ifråga injiceras med hjälp av en kanyl/nål som är monterad på en mikromanipulator, och organet visualiseras med ultraljud, om det behövs. I annat fall används temporalven injektion, eller svansvensinjektion.

Nålstorleken anpassas efter ämnet som injiceras, och injektionsmetod, och minsta möjliga diameter väljs för att minska obehag för musen efter uppvaknande. Volymerna som injiceras är anpassade enligt organet/vävnaden de injiceras i. Operationen (från sövning till uppvaknande) förväntas ta 30 min eller mindre. Innan uppvaknandet märks örat med ett litet standardsnitt för identifikation, eller så markeras svansen med tuschpenna, eller så märks pälsen med en pälsenna. Uppvaknandet är övervakat och sker i en uppvärmd bur. Detta tillvägagångssätt fungerar bra för injektion till t.ex. hjärta, mjälte och njurar. Om ungar används försöker man undvika att musen kannibaliseras (se nedan) eller kvävs av andra ungar i kullen och därför flyttas den inte tillbaka förrän den är helt vaken. Musen kommer att gnidas in med lukt från strö och bomaterial för att försäkra att den återaccepteras av mamman.

Vår erfarenhet av dessa försök är att de tolereras väl av djuren, som vaknar från narkos inom sekunder/minuter, och uppvisar normalt beteende och motorik.

Motivering av åtgärden – varför den behöver göras och varför beskrivet sätt är det bästa sättet att utföra åtgärden på

Vår metod används för genmodifiering, genmanipulering och tillförsel av farmakologiska substanser. Det är en mycket kraftfull metod för att utveckla musmodeller, och eftersom att inga djur behöver korsas kan man använda mycket färre möss. Denna teknik låter oss studera många olika sjukdomar, även de som orsakas av mutationer i flera olika gener, samt hur de samverkar i en in vivo kontext. Genom att använda ultraljud kan nålen styras till exakt rätt ställe för injektion och därmed minskas risken att omkringliggande vävnad skadas.

Beskrivning av vad som ska göras för att minska djurets lidande – både farmakologisk lindring och övriga insatser liksom ökad tillsyn

Bedövningsmedel (isofluran induktion 2-4%, underhåll 1.5-3%) eller vad veterinären i enstaka fall rekommenderar.

Smärtstillande Buprenorfin/Temgesic (0.05-0.1mg/kg,s.c), och/eller Finadyne (2.5mg/kg s.c.) och/eller anti-inflammatoriska smärtstillande (anti inflammatory non steroidal drugs, t.ex meloxicam 5mg/kg SC), och/eller annat av veterinär rekommenderat smärtstillande används innan operation eller annat av veterinär rekommenderat smärtstillande.

Beroende på vilken vävnad och substans som injiceras eller efter samråd med veterinär, kan injektion av buprenorfin komma att upprepas var 6-8e timme.

Ögongel administreras innan proceduren påbörjas. Djuren sövs genom inandning av isofluran (induktion 2-4%, underhåll 1.5-3%).

Efter injektion av ungar som hålls med mamman, kommer tillsyn att ske dagligen med extra avseende på kannibalisering och bortstötning, men i största möjliga mån utan att buren öppnas och mamman störs. Kannibalisering kommer att motverkas genom att musen kommer att gnidas in med lukt från strö och bomaterial för att försäkra att den återaccepteras av mamman.

Åtgärd 3: Luciferas/fluorofor imaging

Ingående beskrivning av åtgärden och hur djuret kommer att påverkas

Vad djuret kommer att utsättas för inklusive försöksperiodens längd för det enskilda djuret.

Beskrivning av hur djuret kommer att påverkas – eventuellt fysiskt och psykiskt lidande.

För att detektera luciferas, utförs följande:

Postnatala möss som injicerats i fosterstadiet mha ultraljuds-styrd injektion, eller gravida honor, vars embryon injicerats, sövs med 3-4 % isofluran. Musungar kan immobiliseras i små pappkartonger, och hållas stilla utan anestesi.

Mössen får en intraperitoneal (ip) injektion med steril luciferin -lösning vid en slutlig koncentration av 150 mg per kg kroppsvikt, för att kunna detektera luciferas. För att avbilda enbart fluorescerande proteiner behövs inte luciferin-lösning.

Mössen flyttas till en uppvärmd plattform inuti bioluminescens detektorn.

Isofluran sänks till 1,5-2,5 % för att upprätthålla anestesi.

Bilder tas i bioluminescens detektorn på 1-5 djur i taget och tar vanligen mellan 10 till 15 minuter. I vissa fall kan detta steg ta upp till en timme, då man gör kinetik experiment för att testa hur snabbt luciferas signalen uppstår, och hur snabbt den försvinner.

I de flesta fallen kommer detta utföras en gång per mus för att testa om de är positiva eller ej.